

実施課題名: タンパク質フォールディング機構解明に向けた人工分子シャペロン材料の開発

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

従来のタンパク質フォールディング研究は、主には試験管内にてフォールディングしやすい理想的な挙動を示すタンパク質の研究に終始してきた。これは安定性が十分でないタンパク質、あるいは凝集性のタンパク質が、その不可逆な沈殿挙動のために、特に溶液NMR実験において取り扱いが困難なためである。もし細胞内における分子シャペロンのように、変性したタンパク質を孤立化させ、凝集を防ぐシステムをサンプルチューブ内に構築することができれば、溶液NMRを用いたタンパク質の構造分析に有用なツールとなる。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

利用者のグループは、直径が最大8 nmにも及ぶ中空パラジウム錯体ケージを合成する技術を有している。今回モデルタンパク質として、Cryptococcus sp.由来のCutinase-Like Enzyme (CLE)を内部に包接した錯体を調整した。酵素活性の評価の結果、空間内に閉じ込めた酵素が通常の溶液状態の酵素と異なる挙動を示すことが明らかになった。この実験結果への裏付けを取るために、ケージの有無、溶媒条件(水-アセトニトリル混合溶媒系)が異なる複数サンプルを用いて、CLEの主鎖・側鎖帰属を行った。解析の結果、ケージに包接されたCLEは、非包接CLEと、運動性の高いループ構造の一部を除き、ほぼ同一の構造を保持していることが明らかになった。一方、混合溶媒のアセトニトリル比率を高めていくと、水:アセトニトリル=20:80程度まで1H-15N HSQCの広いシグナル分布は保持されるが、水:アセトニトリル=10:90まで到達した際にシグナル分布は劇的に縮小する。このシグナル分布の変化は、混合溶媒比の変化に応じて可逆的に変化することを確認しており(リフォールディング)、今後は当該現象に迫るより詳細な実験・解析を行う計画である。

• Fig.1

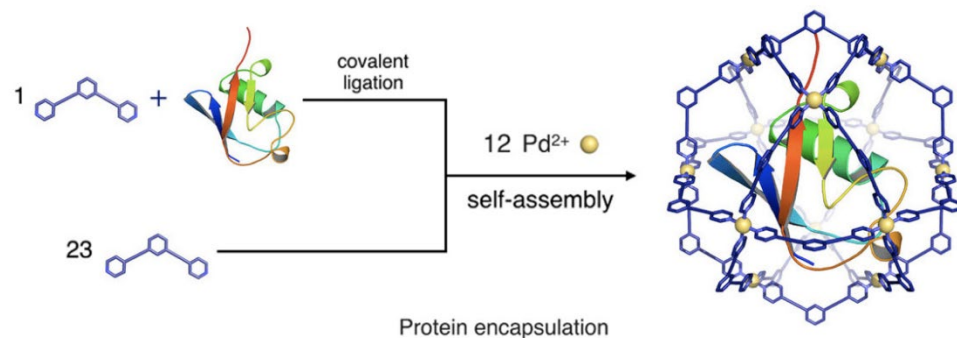


Fig.1 模式図: パラジウム中空ケージ中へのタンパク質の包接

• Fig.2

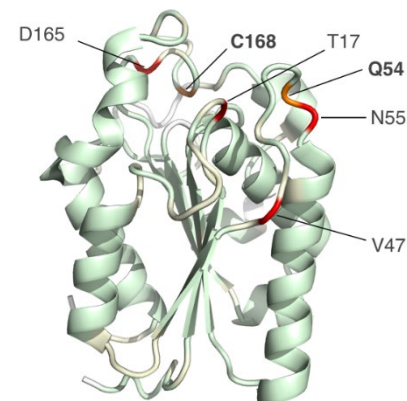


Fig.2 包接により二面角が変化したアミノ酸残基

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF18-01-R-014		
利用課題名	タンパク質フォールディング機構解明に向けた人工分子シャペロン材料の開発		
実施機関名	(前所属) 東京大学 (現所属) 京都大学		
実施部署名	(前所属) 大学院工学系研究科応用化学専攻 (現所属) 高等研究院		
実施責任者管理職名・氏名	職名	(前所属) 助教 (現所属) 准教授	氏名 藤田 大士
実施部署所在地	(前所属) 東京都文京区本郷 7-3-1 (現所属) 京都府京都市左京区吉田本町		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	従来のタンパク質フォールディング研究は、主には試験管内にてフォールディングしやすい理想的な挙動を示すタンパク質の研究に終始してきた。これは安定性が十分でないタンパク質、あるいは凝集性のタンパク質が、その不可逆な沈殿挙動のために、特に溶液 NMR 実験において取り扱いが困難なためである。もし細胞内における分子シャペロンのように、変性したタンパク質を孤立化させ、凝集を防ぐシステムをサンプルチューブ内に構築することができれば、タンパク質のフォールディング研究のみならず、溶液 NMR を用いたタンパク質の構造分析一般にも適用可能な有用なツールとなりうる。この課題に対するアプローチのひとつとして、我々はタンパク質の単分子を精密にカプセル化可能な分子性人工中空構造体を、有機化学・錯体化学の知見を総合し開発してきた。酵素活性評価に基づいた予備的な検討の結果、包接されたタンパク質のその機能を保持すること、またタンパク溶液の安定性は劇的に向上する事がわかった。これら系を実際の溶液 NMR 実験に持ち込み、その有用性の確認・実証と、汎用的なツールにするための最適化を行う。		
利用実施時期、及び期間	平成 30 年 5 月 21 日～平成 30 年 6 月 3 日 総利用日数： 27 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 異動に伴う諸般の事情により計画変更を行った		

利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ (○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1 : 2018 年 5 月 21 日～2018 年 5 月 27 日 利用期間 2 : 20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日
		利用装置② ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 (○) 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1 : 2018 年 5 月 21 日～2018 年 6 月 3 日 利用期間 2 : 20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日
	立体構造解析 パイプライン	・ 発現確認 : 利用回数 回
		・ フォールド判定 : 利用回数 回
		・ 大量調製 : 利用回数 回
		・ 精製試験 : 利用回数 回
・ 多種変異体 : 利用回数 回		
・ SiCode : 利用回数 回		
その他の 利用施設	※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください	
成果の 概要	実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～ 800 字以内(程度)で お書きください。)	※申請書との整合性にご配慮ください。 利用者のグループは、直径が最大 8 nm にも及ぶ中空パラジウム錯体ケージを合成する技術を有している。今回モデルタンパク質として、Cryptococcus sp. 由来の Cutinase-Like Enzyme (CLE) を内部に包接した錯体を調整した。酵素活性の評価の結果、空間内に閉じ込めた酵素が通常の溶液状態の酵素と異なる挙動を示すことが明らかになった。この実験結果への裏付けを取るために、ケージの有無、溶媒条件(水-アセトニトリル混合溶媒系)が異なる複数サンプルを用いて、CLE の主鎖・側鎖帰属を行った。解析の結果、ケージに包接された CLE は、非包接 CLE と、運動性の高いループ構造の一部を除き、ほぼ同一の構造を保持していることが明らかになった。一方、混合溶媒のアセトニトリル比率を高めていくと、水:アセトニトリル=20:80 程度まで 1H-15N HSQC の広いシグナル分布は保持されるが、水:アセトニトリル=10:90 まで到達した際にシグナル分布は劇的に縮小する。このシグナル分布の変化は、混合溶媒比の変化に応じて可逆的に変化することを確認した。なおケージのない条件で測定を行うと、アセトニトリル比率の上昇に伴いタンパク質が不可逆的に沈殿し、NMR シグナルは観測されなくなった。

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>上述のNMRによる結果と、各種分光法、酵素の活性試験の速度論的解析などを総合した結果、空間拘束された酵素は、「nativeの状態と同様に振る舞い同等の酵素活性を保持している」「native酵素が凝集沈殿する条件でも凝集沈殿を起こさない」「室温で長期安定保存可能」「拘束空間中にて部分的変性を起こした場合でも、リフォールディング挙動が観測される」といった期待通りの特性を有していることが明らかになった。しかし、この2018年5月に行った実験によって良好な初期データが得られたものの、異動に伴う諸般の事情により、その後の追加実験は行っていない。</p>
<p>成果発表</p>	<p>学会発表(招待講演):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 43rd International Conference on Coordination Chemistry 2. 第23回京都大学 iCeMS 国際シンポジウム <p>論文発表:</p> <p>初期データをもとに論文は作成。投稿待ち状態。</p>
<p>今後の展開 (字数制限はありませんが300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>現状のタンパク質包接ケージ分子は、いくつかの制限を有していることがわかった。これまでに明らかになってきた制限は主に次の三点である。1) タンパク質の包接条件において、100%水系の条件が達成できず、若干の有機溶剤(ジメチルスルホキシド)の添加が避けられない。2) 骨格形成に用いているピリジン-パラジウムの配位結合の化学的特性により、使用可能なバッファーに制限がかかる。3) 長時間の実験において、ケージの留め金として用いている金属イオン(=パラジウムイオン)の遊離が避けられず、タンパク質によってはこれにより活性を失う可能性がある。今後は、タンパク質包接に適した新しいケージ分子を合成し、汎用性の高い系の構築を目指したい。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見直し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>異動に伴う諸般の事情により、その後の追加実験は行えていない。よって、現時点では社会・経済への波及効果の見通すことができない。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>我々はタンパク質 NMR 測定のまったく素人の状態であったが、理研のスタッフにより、測定パラメータの設定から解析まで、初歩からの手厚いサポートを受けることができ、非常に助かった。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>今後、別課題にてお世話になる際には、またビギナーとして利用することになるので、今回と同様に実験に対する相談からスタートできれば非常にありがたい。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (O) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>